

Tuomas Sopanen

Koivun kukkimisen esto ja nopeuttaminen



Johdanto

Metsäpuiden jalostus ei sovi kärsimättömille; se on tunnetusti hidasta ja vaikeaa. Viime vuosina tapahtunut edistys antaa kuitenkin toivoa puidenkin jalostuksen nopeutumisesta ja tehostumisesta. Parina viime vuosikymmenenä tietämys kasvien elintoiminnoista ja niiden geneettisestä taustasta on kasvanut huimaa vauhtia ja samalla monet tekniikat ovat kehittyneet valtavasti. Perustiedon kasvamisen lisäksi tärkeitä seikkoja ovat olleet mm. molekyyli­markkerien identifiointi, mikrolisäysmenetelmien kehitys sekä geeninsiirtotekniikkojen nopea kehittyminen. Geeninsiirtojen avulla voidaan puiden ominaisuuksia muuttaa halutulla tavalla suhteellisen nopeasti, jos vain tarvittava perustieto on saatavilla. Tämä antaa valtavia mahdollisuuksia metsäpuiden muokkaamiseksi hyvinkin erilaisiin tarkoituksiin sopiviksi.

Geeninsiirtojen käyttöä metsäpuiden jalostuksessa tutkitaan intensiivisesti eri puolilla maailmaa, Suomessakin monien ryhmien tutkimus pyrkii luomaan tälle mahdollisuuksia. Kun geeninsiirtoja käytetään viljelykasvien jalostuksessa, siirrettyjen geenien leviäminen ei tavallisesti ole ongelma. Metsäpuut sen sijaan tietenkin lisääntyvät helposti Suomen luonnossa ja siksi niihin siirretyt geenit leviävät helposti luonnonpopulaatioihin, mikäli tätä ei estetä. Luonnollisesti lähtökohtana on, että jalostuksessa käytetään vain sellaisia siirtogenejä, joilla ei ole oletettavissa mitään haittavaikutuksia ympäristöön tai

ainakin haitat ovat hyötyjä pienemmät. Siirtogeenin vaikutuksista siirtogeeniseen puuhun itseensä tai sen kanssa vuorovaikutuksessa oleviin eliöihin ei kuitenkaan voi tavallisesti olla aivan varma ennen kuin puita on testattu pitkäaikaisissa kenttäkokeissa. Toisaalta siirtogeenien leviämistä ei pidetä hyväksyttävänä, vaikka niistä ei näyttäisikään olevan mitään haittaa.

Meidän ryhmämme lähtökohtana on ollut pienentää siirtogeenisten puiden pitkäaikaisiin kenttäkokeisiin ja kasvatukseen liittyviä ongelmia estämällä siirtogeenien leviäminen. Tämä on tarkoitus saada aikaan tekemällä puut steriileiksi estämällä kokonaan kukintojen tai ainakin kukkien muodostus. Tällöin ei muodostu siemeniä eikä siitepölyä. Kukkimattomuus saattaisi myös lisätä kasvua ja luonnollisesti se estää esim. koivulla allergi­geenisen siitepölyn muodostumisen. Kukkimisen estämistä voitaisiin käyttää myös, jos halutaan estää viljeltyjen vierasperäisten puulajien leviäminen ympäristöön. Onhan olemassa useita esimerkkejä siitä, että vierasperäisestä lajista on aiheutunut ongelmia.

Tutkimuskohteena ryhmällämme on ensisijaisesti koivu, koska se on suomalaisista taloudellisesti tärkeistä metsäpuista ainoa, joka on helppo kloonata ja jolle on olemassa verraten hyvä geeninsiirtomenetelmä. Koivusta onkin tullut metsäpuiden biotekniikan tutkimuksen mallikasvi Suomessa. Kukkimisen estämisen kannalta koivulla on vielä yksi tärkeä lisä­etä. Koivusta on kehitetty Saksassa usean sukupolven ajan tehtyjen risteytysten ja valinnan avul-

la sellaisia kantoja, jotka kukkivat hyvin nuorena. Me olemme saaneet siemeniä näistä puista ja valinneet taimista ne, jotka kukkivat ensimmäisinä. Näin olemme saaneet käyttöömmekaksi koivukloonina, joissa hedekukinnot tulevat näkyviin taimien ollessa noin 4 kuukauden ikäisiä ja noin 50 cm korkeita. Koska geeninsiirto vie noin kuusi kuukautta, voimme näillä klooneilla selvittää jonkin geenikonstruktiivin vaikutuksen kukkimiseen yhdessä vuodessa. Tämä on valtava etu, sillä esim. poppelilla kukkimisen estämistä tutkivien täytyy odottaa lähes 10 vuotta nähdäkseen, estääkö joku geenikonstrukti kukkimisen. Tosin ei tietysti ole itsestään selvää, että siirtogeeni vaikuttaa samalla tavalla nuorina kukkivissa koivuissa kuin tavallisissa.

Kukkimisen estäminen estogeenikonstruktiilla

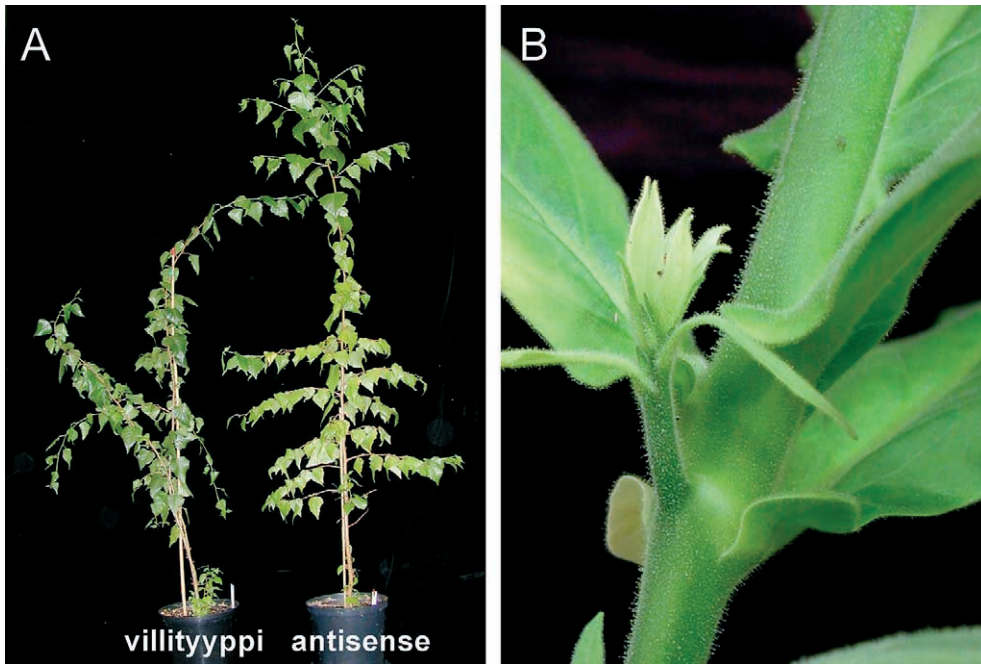
Kukkimisen estämiseksi koivuun siirretään joku tähän tarkoitukseen sopiva geenikonstrukti. Tähän on periaatteeltaan erilaisia mahdollisuuksia. Yksi mahdollisuus estää kukkiminen on käyttää ns. estogeenikonstrukti. Tässä konstruktiivissa on solun kuoleman aikaansaavaa entsyymiä koodittavaan geeniin liitetty sellainen säätelyalue, joka toimii vain kukinnoissa. Tällaisen säätelyalueen vaikutuksesta ko. geeni ei toimi lainkaan koivun kasvullisissa osissa ja koivu kasvaa normaalisti, mutta kun kukinto alkaa kehittyä, kukintospesifinen säätelyalue saa aikaan geenin aktivoitumisen kukinnon aiheissa ja tämän seurauksena kukinnon aiheiden solut kuolevat eikä kukintoa muodostu. Estogeeninä käytämme *Bacillus amyloliquefaciensista* peräisin olevaa ribonukleasigeeniä, *BARNAASI*a, josta on poistettu proteiinin erittymiselle tärkeä alue. Tällöin *BARNAASI*-entsyymi jää solulimaan ja hajottaa solun proteiinisynteesikoneiston. Ehkä on syytä huomauttaa, että ribonukleasit eivät ole ongelmallisia esim. kasveja syöville eläimille; niitä on kaikissa organismeissa, mm. kasvisolujen vakuolissa, eläinten ruoansulatusnesteissä ja ihmisen hiessä.

Vain kukinnoissa toimivan säätelyalueen löytämiseksi olemme eristäneet koivusta sellaisia geenejä, jotka säätelevät kukinnon tai kukan kehitystä. Näiden voi luonnollisesti olettaa toimivan vain kukinnoissa. Useat eristämistämme geneistä toimivatkin

vain kukinnoissa, muutamat sen sijaan toimivat heikosti myös muissa kasvinosissa.

Geenien säätely on monimutkaista ja tavallisesti siihen osallistuu monia säätelyproteiineja, jotka sitoutuvat tavallisesti geenin edessä olevalla säätelyalueella, mutta joskus myös muualla sijaitseviin spesifisiin säätelyelementteihin. Jotta tietäisimme, onko eristämistämme säätelyalueissa kaikki tarvittavat säätelyelementit mukana, testasimme säätelyalueita merkkigeenin avulla ensin lituruohossa ja tupakassa. Näissä kasveissa testaus on paljon nopeampaa kuin koivussa, jolla tulosten saaminen kestää ainakin vuoden verran. Testaus mallikasveilla perustuu siihen, että kasvien säätelyalueet toimivat usein samalla tavalla eri kasveissa. Testien perusteella valitsimme *BpMADSI*-geenin säätelyalueen, joka näytti toimivan spesifisesti kukissa, mutta ei muissa kasvinosissa. Tämä säätelyalue liitettiin sitten *BARNAASI*-geeniin. Taaskin geenikonstrukti testattiin ensin tupakassa ja lituruohossa, koska haluttiin selvittää, voisiko menetelmää soveltaa koivun lisäksi muihinakin puihin tai yleensä muihin kasveihin.

Tupakassa geenikonstrukti saikin aikaan juuri odotetun vaikutuksen. Kuten aina kasveilla, siirtogeenisiä linjoja tehdään useita. Kussakin niistä siirtogeeni on liittynyt eri paikkaan kromosomistossa, ja siitä syystä geeni toimii samasta säätelyalueesta huolimatta erilaisella voimakkuudella. Joissakin linjoissa geenituotetta muodostuu paljon, joissakin vähemmän ja joissakin ei lainkaan. Erityisesti geeninsiirtoja vastustavat pitävät tätä usein haittana, mutta itse asiassa se on usein hyödyksi, sillä täten voidaan valita juuri sopiva ilmentymistaso. Riippuen *BARNAASI*-geenin ilmentymisen vahvuudesta eri linjoissa, tässä kokeessa saatiin tupakoita, joista puuttuivat emit ja heteet, tai sellaisia, joista puuttuivat emien ja heteiden lisäksi myös terälehdet. Voimakkaimmissa linjoissa puuttuivat kukat kokonaan eikä kukintoakaan muodostunut. Kukinnon sijaan syntyi verson kärkeen vain muutamien pienten lehtien muodostama rykelmä (kuva 1B). Kasvu pysähtyi aluksi tähän, mutta jonkin ajan kuluttua yksi tai kaksi hankasilmua alkoi kehittyä, ja muodostui haaroja. Tämän seurauksena siirtogeenisten tupakoiden kasvu jatkui ja kokeen päättyessä niiden muodostama kuiva-aine oli noin kaksinkertainen verrattuna kukkivaan tupakkaan. Tässä tapauksessa siis kukkimisen estäminen on selvästi lisännyt kasvua. Ensimmäistä kuk-



Kuva 1. Kukkimisen estyminen tupakalla ja koivulla. A) Koivussa *BpMADS4*-antisense-konstrukti estää kukintojen muodostumisen. Sillä ei ole havaittu olevan mitään haittavaikutuksia kasvuun. Kuvassa nuorena kukkiva kontrollikoivu ja kukkimaton antisense-konstruktin sisältävä koivu. B) Tupakassa ei *BARNAASI*-geenin vaikutuksesta kukintoa ei muodostunut lainkaan, vaan sen tilalle muodostui verson kärkeen muutaman pienen lehden rykelmä. Kasvin haaroittuminen näkyy myös selvästi kuvasta.

kimatonta tupakkaa on nyt kasvatettu kolme vuotta, eikä se ole koskaan tehnyt yhtään kukkaa, joten ominaisuus näyttää hyvin pysyvältä. Lituruoholla geenikonstrukti esti monessa linjassa kokonaan kukintoverson muodostumisen, mutta sen sijaan muodostui kuuden ruusukelehden sijasta satoja lehtiä. Lituruohollakin siis kasvimassan tuotto lisääntyi huomattavasti.

Geenikonstrukti toimii myös koivussa. Heikoimmissa linjoissa se ei estä kukintojen muodostumista, mutta estää heteiden synnyn. Niiden tilalle tähkäsuomujen hankaan muodostuu vain jonkinlainen kohouma. Voimakkaammissa linjoissa on kukintojen tilalla vain punainen nuppimainen rakenne tai ei sitäkään. Useat siirtogeenisistä linjoista kasvoivat alussa aivan kuten ei-siirtogeeniset kontrollikasvit, mutta joissakin linjoissa oli alusta lähtien havaittavissa kasvun häiriintymistä. Tämä viittasi siihen, että säätelyalue toimi kuitenkin heikosti myös kas-

vullisissa osissa ja sai aikaan *BARNAASI*-proteiinin muodostumista ja siten häiritsi kasvu. Toisissa linjoissa kasvu ei ollut häiriintynyt lainkaan ennen kukkimisikään tuloa, mutta sitten verson kärjet usein haarautuivat kahdeksi yhtä vahvaksi haaraksi. Tämä ilmiö saattaa johtua siitä, että on käytetty nuorena kukkivaa koivukloonaa, mutta nyt ollaan testaamassa, miten tavalliset koivukloonit käyttäytyvät. Jos geenikonstrukti aiheuttaa kasvuhäiriöitä, sitä ei voida käyttää sellaisenaan, mutta tämä selviää vasta pitkien testauksen kuluttua.

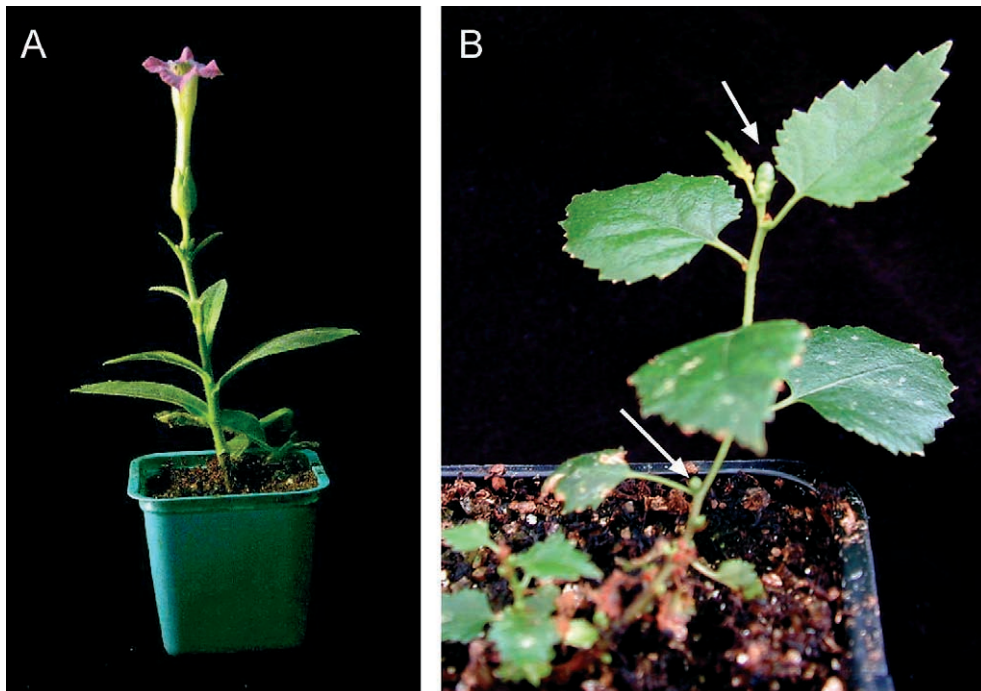
Kukkimisen estäminen antisense-tekniikalla

Periaatteessa toisenlainen keino estää kukintojen muodostuminen on estää jonkin kukkimisen kanalta ehdottoman välttämättömän geenin ilmenty-

minen ns. antisense-tekniikalla. Tässä tekniikassa ko. geeni siirretään kasviin nurinpäin, jolloin sen koodittama antisense-RNA muodostaa oikean lähetti-RNA:n kanssa kaksoisjuosteen, joka hajotetaan. Tällöin siis kukkimisen kannalta välttämätön lähetti-RNA tuhoutuu eikä sen koodittamaa proteiinia muodostu eikä siis kukintoakaan. Olemme siirtäneet koivuun useita tällaisia antisense-RNA:ita, joista useimmat eivät toimi tarpeeksi voimakkaasti estääkseen kukkimisen. Kuitenkin *BpMADS4*-geeniä vastaava antisense-konstruktio saa aikaan hyvin voimakkaan vaikutuksen nuorena kukkivassa koivussa: monessa siirtogeenisessä linjassa se hidastaa ja vähentää huomattavasti kukkimista. Tärkeintä on kuitenkin se, että kahdessa linjassa tämä konstruktio esti kokonaan kukintojen muodostumisen. Vaikka kontrollikoivuissa kukintoja muodostui kaikkiin yksilöihin noin 100 vuorokauden kuluttua ruokuttamisesta,

ei näihin kahteen linjaan ole ilmestynyt kukintoja, vaikka niitä on kasvatettu jo kaksi vuotta. Tässäkin tapauksessa kukkimisen esto siis näyttää pysyvältä. Kasvu näissä kukkimattomissa koivuissa on ollut normaalia (kuva 1A). Teoreettisesti on oletettava, että ko. konstruktilla ei olisi mitään haittavaikutuksia, joten tässä saattaa olla hyvin lupaava keino kukkimisen estämiseksi. Kuitenkin on taaskin otettava huomioon, että tulokset on saatu varhain kukkivalla koivukloonilla ja ne on varmennettava tavallisella koivulla, mikä kestää monta vuotta.

Em menetelmien yhtenä ongelmana on se, että siirretty geenikonstruktio voi lakata toimimasta esim. geenin hiljenemisen tai siinä tapahtuneen mutaation seurauksena. Tästä syystä varmin tapa kukkimisen pysyväksi estämiseksi olisi hävittää koivusta kokonaan joku kukkimisen kannalta välttämätön geeni tai osa tällaisesta geenistä poistogeenitekniikan



Kuva 2. Kukkimisen nopeuttaminen tupakalla ja koivulla. A) *BpMADS4*-geenin yliekspressio saa aikaan tupakan hyvin varhaisen kukkimisen. Kontrollitupakat kukkivat ollessaan noin 1 m:n korkuisia. B) *BpMADS4*-geenin yliekspressio nopeuttaa huomattavasti jo muutenkin nuorena kukkivan koivukloonin kukkimista. Kukinnot on merkitty nuolella.

avulla. Tällöin ei ole minkäänlaista mahdollisuutta, että se alkaisi toimia uudelleen. Poistogeenisten mikrobien ja eläinten tekemiseksi on jo hyviä menetelmiä, mutta kasveilla nämä menetelmät eivät vielä toimi kunnolla. Niitä kuitenkin kehitetään koko ajan, ja luultavasti verraten pian tällainen menetelmä tulee käyttöön. Tällöin esim. *BpMADS4* olisi sellainen geeni, jonka poistaminen varmasti saisi aikaan kukkimattomuuden. Jos taas tyydytään vain heteiden ja emien muodostumisen estämiseen, voitaisiin käyttää lituruohon *AGAMOUS*-geenin vangingeeniä, jota olemme myöskin tutkineet.

Kukkimisen nopeuttaminen

Kukkimisen nopeuttamista voitaisiin käyttää jalostuksen nopeuttamiseen erityisesti, jos voidaan käyttää molekyyli-markkereita haluttujen geenien tunnistamiseksi jo taimiasteella. Tällöin voitaisiin koota yhteen kasviin useamman peräkkäisen risteytyksen avulla haluttuja geenejä monesta kantavanhemmas-ta suhteellisen lyhyessä ajassa. Kun risteytysohjelma on saatettu loppuun, poistettaisiin kukkimista nopeuttava geeni joko valinnan avulla tai jollakin muulla keinolla. Lopputuloksena olisi siis monia haluttuja ominaisuuksia omaava puu, joka ei olisi siirtogeeninen. Luonnollisesti lopullinen testaus vie tässäkin pitkiä aikoja.

Kukkimisen nopeuttaminen on mahdollista esim. siirtämällä kasviin geenikonstruktin, jossa on yleissäätelyalue ja sen perään liitettyä joku kukkimisen aikaansaava geeni. Yleissäätelyalueen vaikutuksesta geeni toimii kaikissa kasvin soluissa, siis myös kasvupisteessä, ja kukkimista nopeuttavan geenin ilmentyminen muuttaa vegetatiivisen kärkikasvupisteen kukintomeristeemiksi. Kun koivuista eristettyjä geenejä tutkittiin tällä tavalla lituruohossa ja tupakassa, useat niistä saivat aikaan kukkimisen aikaistumista. Taaskin eri siirtogeeniset linjat olivat erilaisia, joten on mahdollista valita juuri sopivan voimakas aikaistuminen. Yksi parhaiten toimivista geeneistä tässä suhteessa oli aikaisemmin mainittu *BpMADS4*, jonka ilmentymisen estäminen antisense-tekniikalla esti kukintojen muodostumisen. Kun *BpMADS4*:ää yliekspressoitiin tupakassa, kasvit alkoivat kukkia hyvin nuorena ja itse asiassa koko kasvi muistutti tupakan kukintoa (kuva 2A). Näyttää siis siltä, että

ko. geenin toiminta muuttaa kärkikasvupisteen välittömästi kukintoa muodostavaksi kasvupisteeksi. Mikä mielenkiintoisinta, itse kukat olivat aivan normaalit, ne tuottivat siemeniä ja siemenistä kasvatetut kasvit olivat myöskin varhain kukkivia.

Kun tupakan kukintaa varhaistavan *BpMADS4*-geenin vaikutusta tutkittiin koivulla, se aikaisti huomattavasti muutenkin aikaisin kukkivan koivukloonin kukkimista. Koivukloonin, joka normaalisti alkoi muodostaa kukintoja noin 4 kuukauden ikäisenä, alkoi voimakkaimmassa linjassa muodostaa kukintoja noin 2 viikon ikäisenä. Tässä linjassa kukintoja muodostui kaikista kasvupisteistä, sekä versojen kärjistä että kaikista hankasilmuista ja kasvu pysähtyi siihen. Hieman heikommassa linjoissa kukintoja muodostui vain joihinkin verson kärkiin ja kasvu jatkui normaalisti (kuva 2B). Kukinnot vaikuttivat normaalilta, mutta niiden fertiilisydestä ei vielä ole tietoa. Nyt olemme testaamassa, miten *BpMADS4* vaikuttaa tavalliseen koivukloonin ja poppeliin. Oletuksemme on, että tavallisetkin koivut alkaisivat kukkia muutaman kuukauden tai jopa muutaman viikon ikäisinä, mutta tätä emme vielä tiedä.

Yhteenveto

Kukkimisen estäminen ja nopeuttaminen on siis onnistunut erinomaisesti ruohovartisilla mallikasveilla, joilla kukkimisen estäminen ei ole aiheuttanut haittavaikutuksia ja nopeuttaminen ei ole laskenut fertiiliteettiä. Varhain kukkivalla koivukloonillakin molemmat ovat onnistuneet, mutta toistaiseksi ei tiedetä, miten menetelmät toimivat tavallisella koivulla. Tarkoituksena on vielä kehittää menetelmiä ja sitten alkaa testata niitä ensin kasvihuoneissa, sitten mahdollisesti kenttäkokeissa, jotta saadaan tietoa koivujen käyttäytymisestä erilaisissa luonnonoloissa. Mielestäni mahdollisuudet kukkimisen estämiseksi koivullakin ovat hyvät, ja siten on toivoa lisätä siirtogeenisten koivujen käytön turvallisuutta ja hyväksyttävyyttä merkittävästi. Tämä taas antaa lisämahdollisuuksia jalostukselle ja sitä kautta lisää Suomen metsien käyttömahdollisuuksia ja mahdollisuuksia saada omista metsistä erikoispuulaatua, joita muiden jalostusmenetelmien avulla ei voitaisi saada aikaan tai joiden aikaansaaminen kestäisi hyvin pitkään.

Kirjallisuutta

- Elo, A.K., Lemmetyinen, J., Turunen, M-L., Tikka, L. & Sapanen, T. 2001. Three MADS box genes similar to APETALA1 and FRUITFULL from silver birch (*Betula pendula* Roth). *Physiologia Plantarum* 112: 95–103.
- Lemmetyinen, J., Elo, A.K. & Sapanen, T. 1995. Kukkimattomien koivujen kehittäminen kukintospesifisten geenien avulla. *Metsäntutkimus uusissa puissa: monistusta ja molekyylijä. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574. s. 93–102.*
- , Keinonen-Mettälä, K., Lännpää, M., von Weissenberg, K. & Sapanen, T. 1998. Activity of the CaMV 35 S promoter in various parts of transgenic early-flowering birch clones. *Plant Cell Reports* 18: 243–248.
- , Lännpää, M., Pennanen, T. & Sapanen, T. 2001. Prevention of flowering in dicotyledons. *Molecular Breeding* 7: 341–350.

■ Prof. Tuomas Sapanen, Joensuun yliopisto, biologian laitos
Sähköposti tuomas.sapanen@joensuu.fi